

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-128731

(P2002-128731A)

(43) 公開日 平成14年5月9日(2002.5.9)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーム(参考)
C 0 7 C 59/66		C 0 7 C 59/66	4 C 0 6 9
59/13		59/13	4 H 0 0 6
69/712		69/712	Z
C 0 7 D 207/46		C 0 7 D 207/46	
// G 0 1 N 33/535		G 0 1 N 33/535	
審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-325513(P2000-325513)

(22) 出願日 平成12年10月25日(2000. 10. 25)

(71) 出願人 000237204

富士レビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72) 発明者 丹羽 敏博

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

富士レビオ株式会社内

(72) 発明者 小林 久子

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

富士レビオ株式会社内

(74) 代理人 100098431

弁理士 山中 都生 (外3名)

Fターム(参考) 4C069 AC30 AC36 BC06 CC13

4H006 AA01 AB81 BP30 BS10

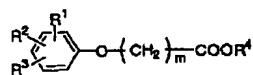
(54) 【発明の名称】 フェノキシ化合物

(57) 【要約】

【課題】 従来の煩雑なPCBの測定法に替わる迅速且つ簡便、低コストのPCBの酵素免疫測定法に用いられる化合物の提供。

【解決手段】 一般式

【化1】

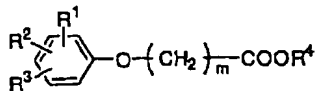


(式中、R<sup>1</sup>は、塩素原子またはフェニル基、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、水素原子または塩素原子、R<sup>4</sup>は、アルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、mは、5ないし7の整数である。)で表されるフェノキシ化合物は、BSAなどと結合させて、PCBを測定する際の酵素免疫測定試薬として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式

【化 1】



で表されるフェノキシ化合物（式中、 $\text{R}^1$ は、塩素原子またはフェニル基、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は、水素原子または塩素原子、 $\text{R}^4$ は、アルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、 $m$ は、5ないし7の整数である。）。

【請求項 2】  $\text{R}^4$ が水素原子である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】  $\text{R}^4$ がアルキル基である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】 アルキル基が低級アルキル基である請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】  $\text{R}^4$ がスクシンイミジル基である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】  $m$ が5である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ が塩素原子である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】  $\text{R}^1$ がフェニル基であり、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ が水素原子である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ が塩素原子、 $\text{R}^4$ が水素原子であり、 $m$ が5である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 10】  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ が塩素原子、 $\text{R}^4$ がアルキル基であり、 $m$ が5である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 11】 アルキル基が低級アルキル基である請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 12】  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ が塩素原子、 $\text{R}^4$ がスクシンイミジル基であり、 $m$ が5である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 13】  $\text{R}^1$ がフェニル基、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ が水素原子、 $\text{R}^4$ が水素原子、 $m$ が5である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 14】  $\text{R}^1$ がフェニル基、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ が水素原子、 $\text{R}^4$ がアルキル基、 $m$ が5である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 15】 アルキル基が低級アルキル基である請求項 14 の化合物。

【請求項 16】  $\text{R}^1$ がフェニル基、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ が水素原子、 $\text{R}^4$ がスクシンイミジル基、 $m$ が5である請求項 1 に記載の化合物。

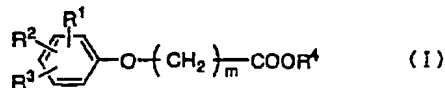
【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般式

【0002】

【化 2】



【0003】（式中、 $\text{R}^1$ は、塩素原子またはフェニル基、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は、水素原子または塩素原子、 $\text{R}^4$ は、アルキル基、アリール基、水素原子またはスクシンイミジル基、 $m$ は、5ないし7の整数である。）で表されるフェノキシ化合物であり、PCBを酵素免疫測定法で測定する際の試薬として使用できる。

【0004】

【従来の技術】フェノキシ化合物は、新規な化合物であり、かつ、この化合物を測定するための試薬として有用である、ということは全く知られていなかった。

【0005】従来、PCBは、ガスクロマトグラフィーとマススペクトロメトリーとを一体化した機器等を用いて測定していたが、これらの測定機器は大変高価であり、また、サンプルが土や水の場合は、これら機器測定前に濃縮操作を行わねばならず、煩雑であった。これらの問題は酵素免疫測定法を採用することで解決することができた。この方法は、迅速かつ簡便、低コストで高感度測定ができる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、酵素免疫測定法でなしえなかったPCBの測定に有用な試薬を提供することが課題である。

【0007】

【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するため本発明者らは、新規な前記一般式（1）で表されるフェノキシ化合物を見出した。本発明の前記一般式（1）で表されるフェノキシ化合物は、PCBを酵素免疫測定法により広汎に測定できる化合物である。

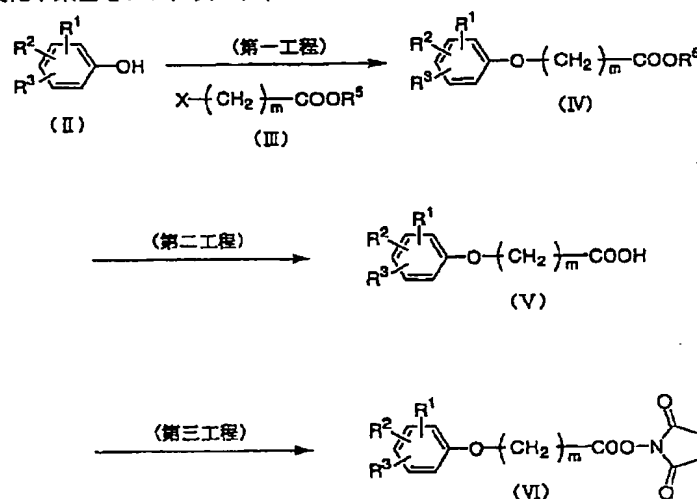
【0008】以下、本発明を詳細に説明するにあたって、「アルキル基」としては、炭素原子数1～12の直鎖状、分枝鎖状または環状のアルキル基のいずれでもよく、例えば、メチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、1-メチルエチル基、シクロプロピル基、 $n$ -ブチル基、2-メチルプロピル基、1-メチルプロピル基、1,1-ジメチルエチル基、シクロブチル基、 $n$ -ペンチル基、3-メチルブチル基、シクロペンチル基、2,2-ジメチルプロピル基、1-メチルシクロブチル基、シクロブチルメチル基、 $n$ -ヘキシル基、4-メチルペンチル基、シクロヘキシル基、1-メチルシクロペンチル基、シクロペンチルメチル基、（1-メチルシクロブチル）メチル基、 $n$ -ヘプチル基、5-メチルヘキシル基、4,4-ジメチルペンチル基、シクロヘプチル基、シクロヘキシルメチル基、（1-メチルシクロペンチル）メチル基、 $n$ -オクチル基、6-メチルヘプチル基、5,5-ジメチルヘキシル基、（1-メチルシクロ

ヘキシル)メチル基、n-ノニル基、7-メチルオクチル基、6-ジメチルヘプチル基、n-デシル基、8-メチルノニル基、7-ジメチルオクチル基、n-インデカシル基、9-メチルデシル基、8-ジメチルノニル基、n-ドデカシル基、10-メチルウンデカシル基、9-ジメチルデカシル基等を挙げることできる。また、「低級アルキル基」としては、前記アルキル基のうち、炭素原子数1~6の直鎖状、分枝鎖状又は環状のアルキル基を挙げる事ができる。

【0009】「アリール基」としては、単環式または多環式であり、さらに環上に1個以上の種々の置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基をいい、例えば、フェニル、メチルフェニル、ジメチルフェニル、メトキシフェニル、ジメトキシフェニル、ニトロフェニル、ジニトロフェニル、クロロフェニル、ジクロロフェニル、ブロモフェニル、ジブロモフェニル、ヨードフェニル、フルオロフェニル、トリフルオロメチルフェニル、アミノフェニル、ヒドロキシフェニル、メルカプトフェニル、α-ナフチル、β-ナフチル基等を挙げる事ができる。

【0010】本発明の前記一般式(1)で表されるフェノキシ化合物は以下の式に従い製造することができる。

【0011】  
【化3】



【0012】(式中、R<sup>1</sup>は、塩素原子またはフェニル基、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、水素原子または塩素原子、R<sup>1</sup>は、アルキル基またはアリール基、mは、5ないし7の整数である。Xは、ハロゲン原子である。)

(第一工程)本工程は、前記一般式(IV)で表わされるエステル誘導体を、一般式(II)で表される置換フェノールと一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとを塩基の存在下、反応させることにより製造する工程である。

【0013】前記一般式(II)で表される置換フェノールとしては、たとえば、モノクロロフェノール、ジクロロフェノール、トリクロロフェノール、フェニルフェノール等を挙げる事ができる。また、一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとしては、たとえば、6-ブロモヘキサ酸エチル、6-ブロモヘキサ酸メチル、6-ブロモヘキサ酸n-ブチル、7-ブロモヘプタン酸エチル、7-ブロモヘプタン酸メチル、7-ブロモヘプタン酸n-ブチル、8-ブロモオクタン酸エチル、8-ブロモオクタン酸メチル、8-ブロモオクタン酸n-ブチル、6-クロロヘキサ酸エチル、6-クロロヘキサ酸メチル、6-クロロヘキサ酸n-ブチル、7-クロロヘプタン酸エチル、7-クロロヘプタン

酸メチル、7-クロロヘプタン酸n-ブチル8-クロロオクタン酸エチル、8-クロロオクタン酸メチル、8-クロロオクタン酸n-ブチルなどを使用することができる。

【0014】本工程は、塩基の存在下に行うものである。使用できる塩基としては、たとえば、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、ナトリウムn-ブトキシド、カリウムn-ブトキシドなどのアルカリ金属アルコキシド、ジエトキシマグネシウムなどのアルカリ土類金属アルコキシド、水素化リチウム、水素化ナトリウム、水素化カリウムなどのアルカリ金属水素化合物、水素化カルシウムなどのアルカリ土類金属水素化合物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどのアルカリ金属炭酸塩等を挙げる事ができる。

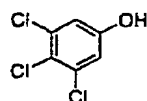
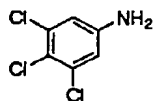
【0015】反応は、不活性溶媒中で行うことが望ましく、たとえばテトラヒドロフラン、ジオキサン、1,2-ジメトキシエタン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等のアミド類を挙げる事ができる。反応温度は、-20~40℃で実施することができる。

(第二工程)本工程は、一般式(IV)で表わされる化合物に対し、塩基性条件下、酸性条件下または中性条件下

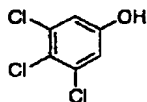
において加水分解を行い、一般式(V)で表わされるカルボン酸誘導体を製造する工程である。

【0016】塩基性条件下で用いる試薬としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属水素化合物、水酸化カルシウム、水酸化バリウムなどのアルカリ土類金属水素化合物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどのアルカリ金属炭酸塩、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、ナトリウムt-ブトキシド、カリウムt-ブトキシドなどのアルカリ金属アルコキシド、トリエチルアミン、イミダゾール、アミジン、DBU (1,5-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデカ-5-エン)、DBN (1,5-ジアザビシクロ[4,3,0]ノナ-5-エン)などの有機塩等を挙げることができる。塩基性条件下で用いる溶媒としては、エタノール、メタノール、エチレングリコール等のアルコール類、水、ジメチルスルホキシド等を挙げることができる。

【0017】また、酸性条件下で用いる試薬としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、磷酸などの鉱酸、酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸、三臭化ホウ素、三塩化ホウ素などのルイス酸、陽イオン交換樹脂等を挙げることができ、中性条件下で用いる試薬としては、ヨウ化リチウム、臭化リチウム、シアン化ナトリウム、チオール類のアルカリ塩等を挙げることができる。酸性または中性条件下で用いる試薬としては、ピリジン、ルチジン、コリジン、ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホリックトリアミドなどの\*



【0022】0℃で、3,4,5-トリクロロアニリン 1.00g (5.6mmol)を無水エタノール100mlに溶解し、42%フルオロホウ素酸3.16ml (15.1mmol)、亜硝酸イソamil 0.92g (7.8mmol)を加え、30分攪拌した。次いで、この溶液を300mlのエーテルに注ぎ、析出した結晶を集めた。得られた結晶に300mlの水を加え、硝酸銅(II)三水合物100g、酸化銅(I)1.29gを加え室温で18時間攪拌した。反応終了後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲル※



\*アミド類、ジメチルスルホキシド、アルコール類、アセトン、水等を挙げることができる。反応温度は、20℃から加熱還流することにより実施できる。

(第三工程)本工程は、一般式(V)で表わされるカルボン酸誘導体に対し縮合剤の存在下、N-ヒドロキシスクシンイミドと反応させ一般式(VI)で表わされるスクシンイミジル誘導体を製造する工程である。

【0018】この工程で使用する縮合剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩、ジイソプロピルカルボジイミド、ベンゾトリアゾリル-N-ヒドロキシトリシメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化合物塩、ジフェニルホスホリルアジド等を挙げることができる。反応は、不活性溶媒中で行うことが望ましく、たとえばジクロロメタン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどのアミド類等を挙げることができる。反応温度は、-10~40℃で実施することができる。

【0019】

【発明の実施の形態】以下、参考例及び実施例により本発明をさらに詳細を説明をする。

【0020】参考例1

3,4,5-トリクロロフェノールの合成

【0021】

【化4】

※クロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=5:1)で精製し、3,4,5-トリクロロフェノール360mg(収率33.7%)を得た。

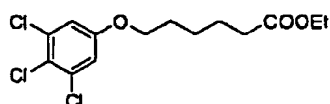
<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.22(bs, 1H), 6.92(s, 2H) ppm.

実施例1

6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0023】

【化5】

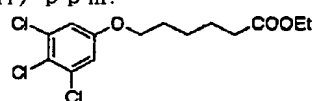


【0024】アルゴン気流下、3,4,5-トリクロロフェノール50mg(0.253mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(5ml)に60%油性水素化ナトリウム11.0mg(0.276mmol)を加え、

室温で15分間攪拌した。続いて6-ブロモヘキサン酸エチル51mg(0.23mmol)を加え、室温で18時間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素

ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル=20:1）で精製し、6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル27mg（収率31.0%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.26 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H), 1.44~1.53 (m, 2H), 1.62~1.74 (m, 2H), 1.775~1.84 (m, 2H), 2.33 (t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 3.92 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H), 4.13 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 6.93 (s, 2H) ppm.



\*

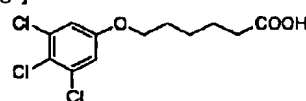
\* IR (liquid film): 2944, 1738, 1588, 1440, 1292, 1250, 1144  $\text{cm}^{-1}$   
Mass ( $m/z$ , %): 342 ( $M^+ + 4$ , 5), 340 ( $M^+ + 2$ , 16), 338 ( $M^+$ , 16), 200 (7), 198 (22), 196 (24), 143 (100), 115 (31), 97 (59), 69 (57).

## 実施例2

6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸の合成

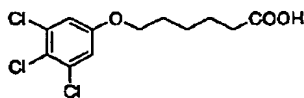
【0025】

【化6】



【0026】6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル374mgを酢酸3mlに溶解し、濃塩酸1mlを加え、2.5時間加熱環流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。酢酸エチル-ヘキサンから再結晶し標記化合物162mg（収率46.8%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.47~1.56 (m, 2H), 1.67~1.76 (m, 2H), 1.76~1.85 (m, 2H), 2.40 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 2H), 3.92 (t,  $J=6.3\text{Hz}$ , 2H), 6.93 (s, 2H) ppm. ※



※ mp: 87.0~88.0°C

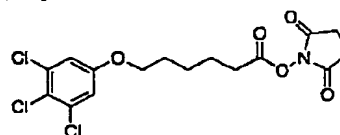
IR (KBr): 3085, 2950, 1712, 1585, 1555, 1440, 1254, 1145  $\text{cm}^{-1}$   
Mass ( $m/z$ , %): 314 ( $M^+ + 4$ , 10), 312 ( $M^+ + 2$ , 32), 310 ( $M^+$ , 33), 200 (30), 198 (97), 196 (100), 115 (86), 97 (59), 69 (61).

## 実施例3

N-スクシンイミジル-6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0027】

【化7】



【0028】6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸100mg (0.32mmol)の無水ジクロロメタン溶液(10ml)にN-ヒドロキシスクシンイミド41mg (0.35mmol)塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド68mg (0.35mmol)を加え、室温で22時間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-ヘキサンから再結晶しN-スクシンイミジル-6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート111mg（収率84.4%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.55~1.63 (m, 2H), 1.78~1.87 (m, 4H), 2.65 (t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 2.94 (bs, 4H), 3.93 (t,  $J=6.2\text{Hz}$ , 2H), 6.94 (s, 2H) ppm.

mp: 88.0~89.0°C

IR (KBr): 2947, 1811, 1787, 1749, 1583, 1555, 1213, 1079  $\text{cm}^{-1}$

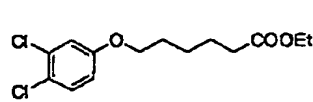
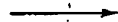
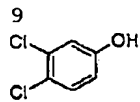
Mass ( $m/z$ , %): 411 ( $M^+ + 4$ , 13), 409 ( $M^+ + 2$ , 39), 407 ( $M^+$ , 40), 297 (9), 285 (27), 293 (27), 200 (9), 198 (27), 196 (28), 97 (100), 69 (90).

## 実施例4

6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

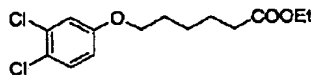
【0029】

【化8】



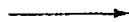
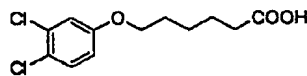
【0030】アルゴン気流下、3,4-ジクロロフェノール500mg (3.07mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(10ml)に炭酸カリウム455mg (3.3mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチル382μl (2.15mmol)を加え、室温で19時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=20:1)で精製し、6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル586mg (収率89.3%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H), 1.44~1.54 (m, 2H), 1.65~1.74 (m, 2H), 1.75~1.83 (m, 2H), 2.33 (t, J=7. \*



【0032】6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル2136mg (7.0mmol)を酢酸3mlに溶解し、濃塩酸2mlを加え、5時間加熱環流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、析出した結晶を濾取し、精製水、ヘキサンにて洗浄後減圧下乾燥し、6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸1807mg (収率93.2%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.48~1.57 (m, 2H), 1.67~1.76 (m, 2H), 1.76~1.84 (m, 2H), 2.40 (t, J=7.4Hz, 2H), 3.93 (t, J=6.3Hz, 2H), 6.74 (dd, J=8.9 and 2.9Hz, 1H), 6.97 (d, J=2.9Hz, 1H), 7.30 (d, J=8.9Hz, 1H) ※



【0034】6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸800mg (2.89mmol)の無水ジクロロメタン溶液(10ml)にN-ヒドロキシスクシンイミド365mg (3.17mmol)塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド608mg (3.17mmol)を加え、室温で24時間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-ヘキサンから再結晶

\* 3Hz, 2H), 3.92 (t, J=6.4Hz, 2H), 4.13 (q, J=7.1Hz, 2H), 6.74 (dd, J=8.8 and 2.9Hz, 1H), 6.97 (d, J=2.9Hz, 1H), 7.30 (d, J=8.8Hz, 1H) ppm.

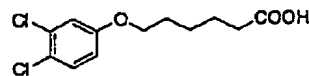
IR (liquid film): 2948, 1738, 1596, 1472, 1232, 1164 cm<sup>-1</sup>  
Mass (m/z, %): 306 (M<sup>+</sup>+2, 15), 304 (M<sup>+</sup>, 23), 164 (29), 162 (46), 143 (100), 115 (29), 97 (56), 69 (49).

#### 実施例5

6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0031】

【化9】



※ ppm.

mp: 128.0~129.0°C

IR (KBr): 3100, 2952, 1716, 1594, 1472, 1284, 1252, 1124, 1050 cm<sup>-1</sup>

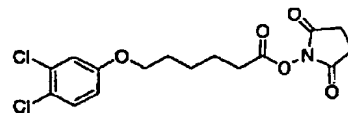
Mass (m/z, %): 278 (M<sup>+</sup>+2, 16), 276 (M<sup>+</sup>, 24), 164 (64), 162 (100), 115 (61), 97 (49), 69 (50).

#### 実施例6

N-スクシンイミジル-6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0033】

【化10】

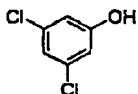


しN-スクシンイミジル-6-(3,4-ジクロロフェノキシ)ヘキサノエート1048mg (収率97.0%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.57~1.64 (m, 2H), 1.78~1.87 (m, 4H), 2.65 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.85 (bs, 4H), 3.94 (t, J=6.3Hz, 2H), 6.74 (dd, J=8.8 and 2.9Hz, 1H), 6.98 (d, J=2.9Hz, 1H), 7.30 (d, J=8.8Hz, 1H) ppm.

11

mp: 96.0~96.5°C

IR (KBr): 2940, 1810, 1740, 1602, 1486, 1238, 1212, 1084 cm<sup>-1</sup>Mass (m/z, %): 375 (M<sup>+</sup>+2, 37), 373 (M<sup>+</sup>, 56), 261 (21), 259 (33), 164 (40), 162 (62), 97 (10) \*

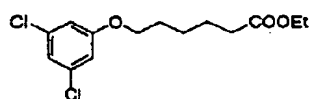
\*0), 69 (84).

## 実施例7

6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0035】

【化11】



【0036】アルゴン気流下、3,5-ジクロロフェノール500mg (3.07mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(10ml)に炭酸カリウム455mg (3.3mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチル382μl (2.15mmol)を加え、室温で21時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=20:1)で精製し、6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル591mg (収率90.1%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H), 1.43~1.53 (m, 2H), 1.65~1.75 (m, 2H), 1.75~1.83 (m, 2H), 2.33 (t, J=7. ※



※4Hz, 2H), 3.92 (t, J=6.4Hz, 2H), 4.13 (q, J=7.1Hz, 2H), 6.77 (d, J=1.8Hz, 2H), 6.93 (t, J=1.8Hz, 1H) ppm.

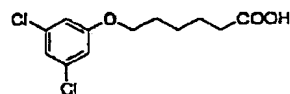
IR (liquid film): 2948, 1736, 1590, 1572, 1448, 1262, 1034 cm<sup>-1</sup>Mass (m/z, %): 306 (M<sup>+</sup>+2, 10), 304 (M<sup>+</sup>, 16), 164 (16), 162 (23), 143 (100), 115 (32), 97 (65), 69 (66).

## 実施例8

6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸の合成

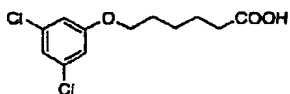
【0037】

【化12】

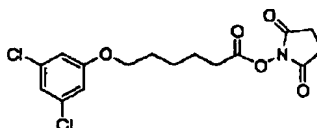


【0038】6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル2136mg (7.0mmol)を酢酸3mlに溶解し、濃塩酸2mlを加え、5時間加熱環流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、析出した結晶を濾取し、精製水、ヘキサンにて洗浄後減圧下乾燥し、6-(3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸1933mg (収率99.6%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.47~1.56 (m, 2H), 1.67~1.76 (m, 2H), 1.76~1.84 (m, 2H), 2.40 (t, J=7.4Hz, 2H), 3.93 (t, J=6.3Hz, 2H), 6.78 (d, J=1.8Hz, 2H), 6.94 (t, J=1.8Hz, 1H) ppm.



★



★mp: 57.0~58.5°C

IR (KBr): 3096, 2960, 1704, 1588, 1468, 1260, 1204, 1090, 1046 cm<sup>-1</sup>Mass (m/z, %): 278 (M<sup>+</sup>+2, 14), 276 (M<sup>+</sup>, 22), 164 (48), 162 (76), 143 (100), 115 (79), 97 (92), 69 (89).

## 実施例9

N-スクシンイミジル-6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサノエートの合成

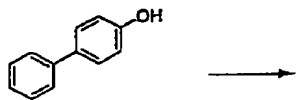
【0039】

【化13】

13

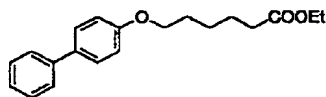
【0040】6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサノ酸800mg(2.89mmol)の無水ジクロロメタン溶液(10ml)にN-ヒドロキシスクシンイミド365mg(3.17mmol)塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド608mg(3.17mmol)を加え、室温で24時間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-ヘキサンから再結晶しN-スクシンイミジル-6-(3,5-ジクロロフェノキシ)ヘキサノエート911mg(収率84.4%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.55~1.64 (m, 2H), 1.77~1.87 (m, \*



【0042】4-フェニルフェノール851mg(5.0mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(10ml)に炭酸カリウム1380mg(10.0mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチル1171mg(5.25mmol)を加え、室温で3日間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-ヘキサンから再結晶し6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸エチル1.06g(収率68.1%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.26 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H), 1.48~1.57 (m, 2H), 1.68~1.76 (m, 2H), 1.79~1.87 (m, 2H), 2.35 (t,  $J=7.5\text{Hz}$ , 2H), 4.00 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H), 4.14 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 6.96 (d with fine coupling,  $J=$ ※



【0044】6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸エチル630mg(2.0mmol)をエタノール40mlに溶解し、4N水酸化ナトリウム水溶液0.8ml(3.2mmol)を加え室温で22時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧下留去し、1N塩酸水溶液にて酸性とした後、クロロホルム、メタノールの混合溶媒で抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。酢酸エチル-エーテル-ヘキサンから再結晶し6-(4-フェニルフェノキシ)

14

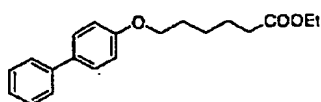
\*4H), 2.65 (t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 2.85 (bs, 4H) 3.94 (t,  $J=6.3\text{Hz}$ , 2H), 6.78 (d,  $J=1.8\text{Hz}$ , 2H), 6.94 (t,  $J=1.8\text{Hz}$ , 1H) ppm.  
IR (liquid film): 2952, 1814, 1784, 1746, 1590, 1448, 1374, 1212, 1070  $\text{cm}^{-1}$   
Mass ( $m/z$ , %): 375 ( $M^+$ , 2.31), 373 ( $M^+$ , 45), 261 (36), 259 (5), 97 (100), 69 (98).

## 実施例10

6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0041】

【化14】



20×8.8Hz, 2H), 7.30 (t with fine coupling,  $J=7.4\text{Hz}$ , 1H), 7.42 (t with fine coupling,  $J=7.7\text{Hz}$ , 2H), 7.51 (d with fine coupling,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 7.55 (d with fine coupling,  $J=8.2\text{Hz}$ , 2H) ppm.

mp: 53.5~54.0°C

IR (KBr): 2944, 1740, 1602, 1480, 1252, 1180, 1038  $\text{cm}^{-1}$ 

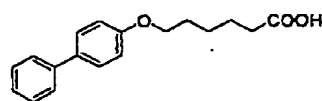
30 Mass ( $m/z$ , %): 312 ( $M^+$ , 75), 170 (100), 143 (70), 115 (25), 97 (22), 69 (19).

## 実施例11

6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0043】

【化15】



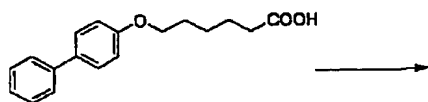
ヘキサン酸489mg(収率85.4%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.52~1.61 (m, 2H), 1.70~1.79 (m, 2H), 1.80~1.88 (m, 2H), 2.42 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 2H), 4.01 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H), 6.96 (d with fine coupling,  $J=8.8\text{Hz}$ , 2H), 7.30 (t with fine coupling,  $J=7.3\text{Hz}$ , 1H), 7.41 (t with fi



15

ne coupling,  $J=7.6\text{ Hz}$ , 2H), 7.51 (d with fine coupling,  $J=8.8\text{ Hz}$ , 2H), 7.55 (d with fine coupling,  $J=7.1\text{ Hz}$ , 2H) ppm.  
 mp: 118.0~118.5°C  
 IR (KBr): 3040, 2944, 1702, 1616, 1494, 1292, 1250, 1204, 10\*



【0046】6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサノ酸489mg (1.72mmol)の無水ジクロロメタン溶液(15ml)にN-ヒドロキシスクシンイミド218mg (1.89mmol)塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド362mg (1.89mmol)を加え、室温で2日間攪拌した。反応終了後、1N塩酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサノ-酢酸エチル=3:1)で精製し、酢酸エチル-ヘキサノから再結晶しN-スクシンイミジル-6-(4-フェノキシ)ヘキサノエート477mg (収率72.6%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.58~1.67 (m, 2H), 1.81~1.90 (m, 4H), 2.67 (t,  $J=7.4\text{ Hz}$ , 2H), 2.84 (bs, 4H), 4.02 (t,  $J=6.3\text{ Hz}$ , 2H), 6.96 (d with fine coupling,  $J=8.8\text{ Hz}$ , 2H), 7.30 (t with fine coupling,  $J=7.4\text{ Hz}$ , 1H), 7.41 (t with fine coupling,  $J=7.6\text{ Hz}$ , 2H), 7.51 (d with fine coupling,  $J=9.0\text{ Hz}$ , 2H), 7.55 (d with fine coupling,  $J=7.1\text{ Hz}$ , 2H) ppm.  
 mp: 112.0~113.0°C

IR (KBr): 2948, 1814, 1782, 1730, 1612, 1488, 1386, 1252, 1202, 1066 cm<sup>-1</sup>

Mass (m/z, %): 381 (M<sup>+</sup>, 45), 170 (100).

#### 参考例2

ウシ血清アルブミン(BSA)結合3,4,5-トリクロロフェノール(TCP-BSA)の合成

ウシ血清アルブミン 5.0mgを 0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)900μlに溶解し、N-スクシン

16

\*52 cm<sup>-1</sup>

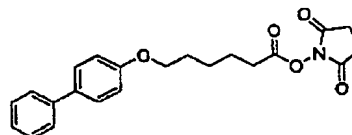
Mass (m/z, %): 284 (M<sup>+</sup>, 74), 170 (100).

#### 実施例12

N-スクシンイミジル-6-(4-フェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0045】

【化16】



イミジル-6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート 1.1mgの無水ジメチルホルムアミド溶液 100μlを加え、室温で5時間攪拌した。その後反応液をPBS中で透析し脱塩して、標記TCP-BSAを得た。

【0047】参考例3

ウシ血清アルブミン(BSA)結合ビフェニル(BP-BSA)の合成

BSA 5.0mgを 0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)900μlに溶解し、N-スクシンイミジル-6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサノエート 1.0mgの無水ジメチルホルムアミド溶液 100μlを加え、室温で終夜攪拌した。その後反応液をPBS中で透析し脱塩して、標記BP-BSAを得た。

【0048】参考例4

ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成

カルボキシル化フェライト粒子(日本ペイント社製)を 0.1Mリン酸緩衝液(pH5.0)にて3回洗浄し、同緩衝液 1mlにて懸濁後、5~20μg/mlに調整した参考例3で作成したBP-BSA溶液 1mlを添加し 25°C 2時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05Mメス緩衝液(pH5.5) 1mlに懸濁し、80mg/mlの塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(ナカライタスク社製)水溶液を 50μl添加して、ローテーターで 25°C 30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を 2ml添加しローテーターで 37°C一晩回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を 1.5%に合わせてBP-BSA感作粒子を得た。

【0049】また、前記BP-BSAの代えてウシ血清アルブミン結合PCB#77(PCB#77-BSA; KRI社製)を用いてPCB#77-BSA感作粒子を得た。

【0050】参考例5

アルカリフォスファターゼ標識抗PCB#77抗体の作成

抗PCB#77モノクローナル抗体(PCB77B抗体; KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(ALP; オリエンタル社製)を結合しALP標識抗PCB#77抗体を得た。

#### 【0051】参考例6

PCB#77(3, 3', 4, 4'-テトラクロロビフェニル)の測定

PCB#77の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミバルスf; 富士レリオ社製)を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例4で作成したBP-BSA感作粒子またはPCB#77-BSA感作粒子液各150μlにPCB#77の標準抗原液90μlとALP標識抗PCB#77抗体液50μlを加え、37℃20分間免疫反応を行い、洗浄後基質(AMPP \*

\*D)液200μlを加えて37℃5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0052】前記標準抗原液は、PCB#77(ジーエルサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド溶液に溶解して作成した。PCB#77は0~100ng/mlの濃度に調整し、標準抗原0濃度のカウント値を100%とした時の各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図1に示す。感作粒子について、PCB#77-BSA感作粒子とBP-BSA感作粒子とを比較したところ、BP-BSA感作粒子を用いた方の感度が高かった。その結果を表1に示す。

#### 【0053】

#### 【表1】

表-1 PCB誘導体と代替誘導体の比較						
	PCB#77測定系		PCB#126測定系		PCB#169測定系	
	BP-BSA*	PCB#77-BSA	TCP-BSA**	PCB#126-BSA	TCP-BSA	PCB#169-BSA
IC15%	1	3	0.2	0.8	0.3	1.0
IC50%	6.3	37.5	2.8	3.1	2.1	3.3

単位は ng/ml

\*BP:ビフェニル

\*\*3,4,5-TCP:トリクロロフェノール

【0054】また、BP-BSA感作粒子を用いたPCB#77測定系に対するPCB#126とPCB#169の交叉反応性を確認したところ、PCB#126と16.3%の交叉反応性が認められたが、PCB#1\*

\*69との交叉反応性は認められなかった。

#### 【0055】

#### 【表2】

表-2 交叉反応性-1

	PCB#77測定系	PCB#126測定系	PCB#169測定系
PCB#77	-	7.1	6.3
PCB#126	16.3	-	100
PCB#169	-	<1	-

\*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 % )。

#### 【0056】参考例7

ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成  
カルボキシル化フェライト粒子(日本ペイント社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH5.0)にて3回洗浄し、同緩衝液1mlにて懸濁後、5~20μg/mlに調整した参考例2で作成したTCP-BSA溶液1mlを添加し25℃2時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05Mメス緩衝液(pH5.5)1mlに懸濁し、80mg/mlの塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(ナカライタスク社製)水溶液を50μl添加して、ローテーターで25℃30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を2ml添加しローテーターで37℃一晚回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を1.5%に合わせてTCP-BSA感作粒子を得た。

【0057】また、前記TCP-BSAに代えてウシ血清アルブミン結合PCB#126(PCB#126-BSA; KRI社製)を用いてPCB#126-BSA感作粒子を得た。

#### 【0058】参考例8

アルカリフォスファターゼ標識抗PCB#126抗体の作成

抗PCB#126モノクローナル抗体(PCB77A抗体; KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(ALP; オリエンタル社製)を結合しALP標識抗PCB#126抗体を得た。

#### 【0059】参考例9

PCB#126(3, 3', 4, 4', 5-ペンタクロロビフェニル)の測定

PCB#126の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミバルスf; 富士レリオ社製)を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例7で作成したTCP-BSA感作粒子またはPCB#126-BSA感作粒子液各150μlに標準抗原90μlと酵素標識抗体液50μlを加え、37℃20分間免疫反応を行い、洗浄後基質液200μlを加えて37℃5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0060】前記標準抗原液は、PCB#126(ジーエルサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド

溶液に溶解して作成した。PCB#126は0~10 ng/mlの濃度に調整し、標準抗原0濃度のカウント値を100%とした時の各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図2に示す。感作粒子について、TCP-BSA感作粒子と PCB#126-BSA感作粒子とを比較したところ、TCP-BSA感作粒子を用いた方の感度が高かった。その結果を表1に示す。

【0061】また、TCP-BSA感作粒子を用いた PCB#126測定系に対する PCB#77と PCB#169の交叉反応性を確認したところ、PCB#77と7.1%の交叉反応性が認められたが、PCB#169とはほとんど交叉反応性は認められなかった。

#### 【0062】参考例10

ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成  
参考例2の TCP-BSAに代えて PCB#169-BSA(KRI社製)を用いて PCB#169-BSA感作粒子を得た。

参考例11 アルカリフォスファターゼ標識体抗 PCB#169抗体の作成

抗PCB#169モノクローナル抗体(PCB169E抗体; KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(ALP; オリエンタル社製)を結合し ALP標識抗PCB#169抗体を得た。

#### 【0063】参考例12

PCB#169(3, 3', 4, 4', 5, 5'-ヘキサクロビフェニル)の測定

PCB#169の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミバルス f; 富士レビオ社製)を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例7で作成したすなわち

TCP-BSA感作粒子または参考例10で作成した PCB#169-BSA感作粒子液各 150  $\mu$ l に標 \*

\* 準抗原 90  $\mu$ l と酵素標識抗体液 50  $\mu$ l を加え、37  $^{\circ}$ C 20分間免疫反応を行い、洗浄後基質液 200  $\mu$ l を加えて 37  $^{\circ}$ C 5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0064】前記標準抗原液は、PCB#169(ジエールサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド溶液に溶解して作成した。PCB#169は0~10 ng/mlの濃度に調整し、標準抗原0濃度のカウント値を100%とした時の各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図3に示す。感作粒子について、TCP-BSA感作粒子と PCB#169-BSA感作粒子とを比較したところ、TCP-BSA感作粒子を用いた方の感度が高かった。その結果を表1に示す。

【0065】また、TCP-BSA感作粒子を用いた PCB#169測定系に対する PCB#77と PCB#126の交叉反応性を確認したところ、PCB#77と6.3%、PCB#126とは100%の交叉反応性が認められた。

#### 20 【0066】

【発明の効果】本発明の一般式(1)で表されるフェノキシ化合物は、PCBを測定するための試薬として有用である。本発明の一般式(1)で表されるフェノキシ化合物は、例えばBSAと結合させて、酵素免疫測定法によるPCBの測定に用いることができる。

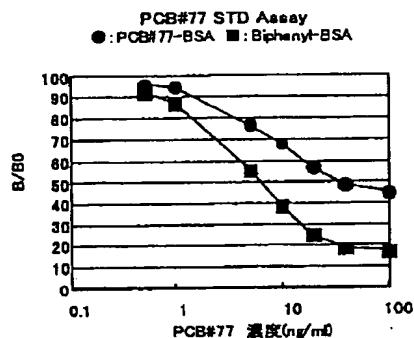
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】PCB#77を測定したときの標準曲線を示す。

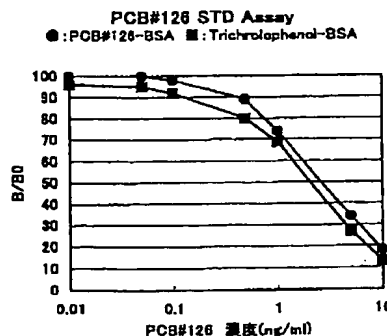
【図2】PCB#126を測定したときの標準曲線を示す。

【図3】PCB#169を測定したときの標準曲線を示す。

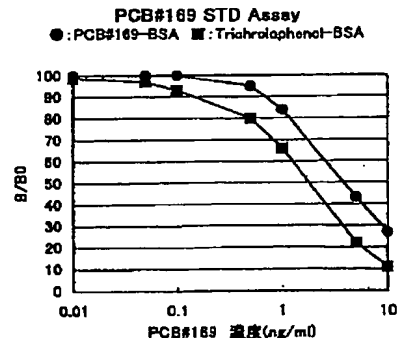
【図1】



【図2】



【図3】



Date of Laid-Open: May 9, 2002

Application No.: 2000-325513

Filing date : October 25, 2000

Applicant: Fujirebio Inc.

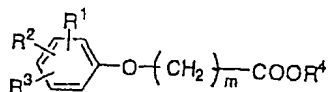
Inventors: NIWA Toshihiro and KOBAYASHI Hisako

Title of the invention: Phenoxy compound

A. Translation of claims

1. A phenoxy compound represented by the following general formula

[Compound 1]



wherein R<sup>1</sup> is a chlorine atom or a phenyl group, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> are independently a hydrogen atom or a chlorine atom, R<sup>4</sup> is an alkyl group, an aryl group, a hydrogen atom or a succinimidyl group, and m is an integer of 5 to 7.

2. The compound of claim 1, wherein R<sup>4</sup> is a hydrogen atom.
3. The compound of claim 1, wherein R<sup>4</sup> is an alkyl group.
4. The compound of claim 3, wherein the alkyl group is a lower alkyl group.
5. The compound of claim 1, wherein R<sup>4</sup> is a succinimidyl group.
6. The compound of claim 1, wherein m is 5.
7. The compound of claim 1, wherein R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, and R<sup>3</sup> are halogen atoms.
8. The compound of claim 1, wherein R<sup>1</sup> is a phenyl group, and R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> are hydrogen atoms.
9. The compound of claim 1, wherein R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> are halogen atoms, R<sup>4</sup> is a hydrogen atom, and m is 5.

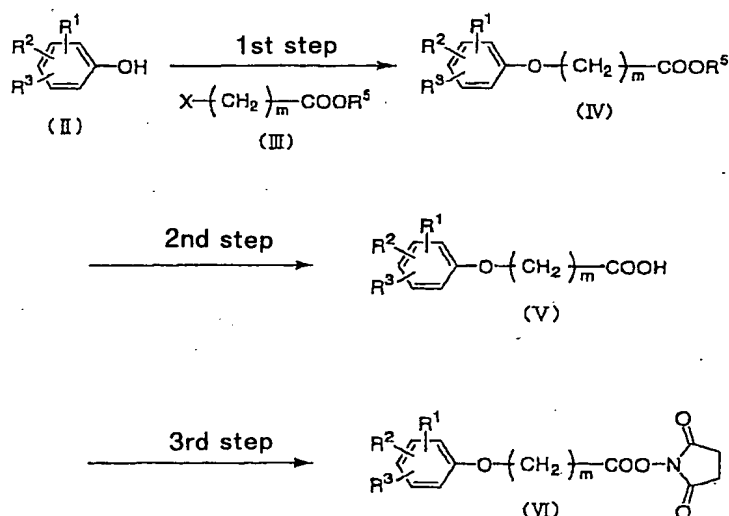
10. The compound of claim 1, wherein  $R^1$ ,  $R^2$  and  $R^3$  are chlorine atoms,  $R^4$  is an alkyl group, and  $m$  is 5.
11. The compound of claim 10, wherein the alkyl group is a lower alkyl group.
12. The compound of claim 1, wherein  $R^1$ ,  $R^2$  and  $R^3$  are chlorine atoms,  $R^4$  is a succinimidyl group, and  $m$  is 5.
13. The compound of claim 1, wherein  $R^1$  is a phenyl group,  $R^2$  and  $R^3$  are hydrogen atoms,  $R^4$  is a hydrogen atom, and  $m$  is 5.
14. The compound of claim 1, wherein  $R^1$  is a phenyl group,  $R^2$  and  $R^3$  are hydrogen atoms,  $R^4$  is an alkyl group, and  $m$  is 5.
15. The compound of claim 14, wherein the alkyl group is a lower alkyl group.
16. The compound of claim 1, wherein  $R^1$  is a phenyl group,  $R^2$  and  $R^3$  are hydrogen atoms,  $R^4$  is a succinimidyl group, and  $m$  is 5.

B. Translation of [0010] to [0012] and 1st to 4th line of [0013]

[0010]

A phenoxy compound represented by the above mentioned formula (I) can be prepared by a process shown by the following scheme:

[0011]



[0012]

wherein  $R^1$  is a chlorine atom or a phenyl group,  $R^2$  and  $R^3$  are independently a hydrogen atom or a chlorine atom,  $R^5$  is an alkyl group or an aryl group, and  $m$  is an

integer of 5 to 7. X is a halogen atom.

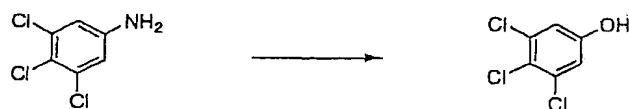
(First step) This step is conducted to produce an ester derivative represented by the formula (IV) by reacting a substituted phenol represented by formula (II) and a halogenated fatty acid ester represented by formula (III) in the presence of a base.

[0013]

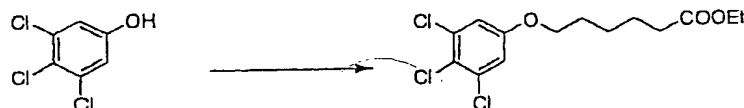
As the substituted phenol represented by the formula (II), for example, monochlorophenol, dichlorophenol trichlorophenol, phenylpehnol and the like can be used.

#### D. Translation of [0021], [0023], [0025] and [0027]

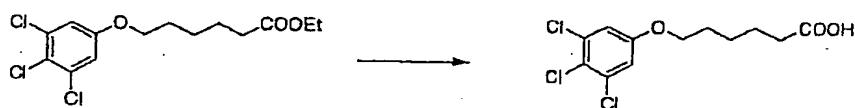
[0021]



[0023]



[0025]

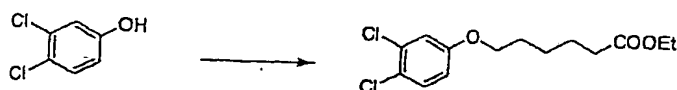


[0027]

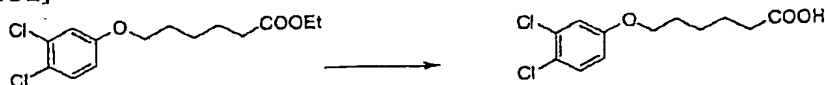


#### E. Translation of [0029], [0031], [0033] and [0035]

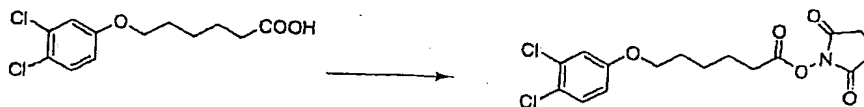
[0029]



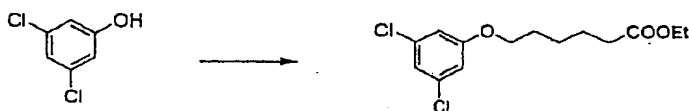
[0031]



[0033]



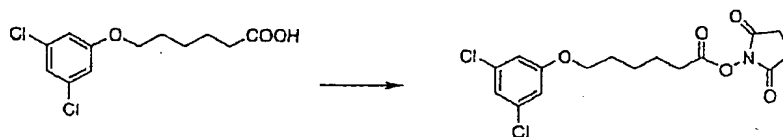
[0035]



[0037]



[0039]



#### F. Translation of Reference example 2 in [0046], and [0047] to [0069]

##### Reference example 2

Synthesis TCP-BSA which is a 3,4,5-trichlorophenol to which bovine serum albumin is bound

Five mg of bovine serum albumin was dissolved into 900  $\mu$ l of 0.1M phosphate buffer (pH7.5). A hundred  $\mu$ l of anhydrous dimethylformamide solution containing 1.1 mg of N-succinimidyl-6-(3,4,5-trichlorophenoxy)hexanoate was added to this suspension and stirred for 5 hours at a room temperature. Dialysis of the reaction mixture was performed against PBS to remove salts, and the TCP-BSA was obtained.

[0047]

##### Reference example 3

Synthesis BP-BSA which is a biphenyl to which bovine serum albumin is bound

Five mg of BSA was dissolved in 900  $\mu$ l of 0.1M phosphate buffer (pH7.5). A hundred  $\mu$ l of anhydrous dimethylformamide solution containing 1.0 mg of N-succinimidyl-6-

(4-phenylphenoxy)hexanoate was added and stirred overnight at a room temperature. Dialysis of the reaction mixture was performed against PBS so as to remove salts, and thus, the BP-BSA was obtained.

[0048]

#### Reference example 4

##### Preparation of sensitizing particles of hapten-BSA

Carboxylated ferrite particles (Nippon Paint Co., Ltd.) were washed with 0.1M phosphate buffer pH5.0 three times and suspended in 1ml of the buffer. To the suspension, 1 ml of a BP-BSA solution prepared in Reference example 3 with a concentration of 5 to 20  $\mu$ g/ml was added, and the mixture was rotated at 25°C, for 2 hours with a rotator. The particles were washed and suspended in 1ml of 0.05M Mess buffer (pH5.5). To the suspension, 50  $\mu$ l of 80 mg/ml of aqueous solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (Nacalai tesque) was added, and the resultant mixture was reacted at 25°C for 30 minutes with rotation in a rotator. The particles are washed, and 2ml of post coat buffer was added and rotated at 37°C overnight in a rotator. The particles were washed and a particle concentration was adjusted to 1.5% so as to obtain BP-BSA sensitizing particles.

[0049]

PCB#77-BSA sensitizing particles were prepared in the same manner as mentioned above in which BSA bound PCB#77(PCB#77-BSA: KRI) was used instead of BP-BSA

[0050]

#### Reference example 5

##### Preparation of anti-PCB#77 antibody labeled with alkaliphosphatase

Alkaliphosphatase (ALP; Oriental Co., Ltd.) was bond to PCB#77 monoclonal antibody (PCB77B antibody; KRI), using maleimide, so as to obtain ALP labeled anti-PCB#77 antibody.

[0051]

#### Reference example 6

##### Measurement of PCB#77 (3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl)



Measurement of PCB#77 was performed with one step competitive assay using full automatic chemical luminescence immunoassay system (Lumipulse f. Fujirebio Inc.). To each 150  $\mu$ l suspension of BP-BSA sensitizing particles and PCB#77-BSA sensitizing particles prepared in Reference example 4, 90  $\mu$ l of standard antigen solution of PCB#77 and 50  $\mu$ l of ALP labeled anti-PCB#77 antibody solution was added. The immune reaction was performed at 37°C for 20 minutes. After washing the particles, 200  $\mu$ l of a substrate (AMPPD) solution was added, enzyme reaction was performed at 37°C, for 20 minutes, and luminescence was assayed.

[0052]

The standard antigen solution was prepared by dissolving PCB#77 (GL Sciences Inc.) in 10% dimethylsulfoxide solution. PCB#77 concentration was adjusted to 0 to 100ng/ml. Standard curve was prepared by plotting a response obtained from each concentration of standard antigen solutions (B/B<sub>0</sub>) when response of a count of 0% of standard antigen solution was set to 100%. Results are shown in Figure 1. Compared with PCB#77-BSA sensitizing particles and BP-BSA sensitizing particles, BP-BSA sensitizing particles had higher sensitivity. Results are shown in Table 1.

[0053]

[Table 1]

Table1 comparison of PCB derivative and substituting derivatives their of						
	PCB#77 system		PCB#126 system		PCB#169 system	
	BP-BSA* PCB#77-BSA		TCP-BSA** PCB#126-BSA		TCP-BSA PCB#169-BSA	
IC 15%	1	3	0.2	0.6	0.3	1.0
IC 50%	6.3	37.5	2.8	3.1	2.1	3.3

unit: ng/l

\*BP:biphenyl

[0054]

\*\*3,4,5-TCP; Trichloriphenol

In the PCB#77 measuring system, using BP-BSA sensitizing particles, cross reactivity with PCB#126 and PCB#169 was measured. The cross reactivity was 16.3% with PCB#126, whereas no cross reactivity with PCB#169 was found.

[0055]

[Table 2]

Table2 cross reactivity - 1			
	PCB#77 system	PCB#126 system	PCB#169 system
PCB#77		7.1	6.3
PCB#126	16.3		100
PCB#169	-	<1	

\*: measured from concentration having 50% inhibition (unit %)

[0056]

#### Reference Example 7

##### Preparation of sensitizing particles of hapten-BSA

Carboxylated ferrite particles (Nippon Paint Co., Ltd.) were washed with 0.1M phosphate buffer pH5.0 three times and suspended to 1ml of the buffer. To the suspension, 1 ml of a TCP-BSA solution prepared in Reference example 2 with a concentration of 5 to 20  $\mu$ g/ml was added, and the mixture was rotated at 25°C, for 2 hours with a rotator. The particles were washed and suspended in 1ml of 0.05M Mess buffer (pH5.5). To the suspension, 50  $\mu$ l of 80 mg/ml of aqueous solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (Nacalai tesque) was added, and the resultant mixture was reacted at 25°C for 30 minutes with rotation in a rotator. The particles are washed, and 2ml of post coat buffer was added and rotated at 37°C overnight in a rotator. The particles were washed and a particle concentration was adjusted to 1.5% so as to obtain TCP-BSA sensitizing particles.

[0057]

PCB#126-BSA sensitizing particles were prepared in the same manner in which BSA bound PCB#126 (PCB#126-BSA: KRI) was used instead of TCP-BSA

[0058]

#### Reference example 8

##### Preparation of anti-PCB#126 antibody labeled with alkaliphosphatase

Alkaliphosphatase (ALP; Oriental Co., Ltd.) was bond to PCB#126 monoclonal antibody (PCB77A antibody; KRI), using maleimide, so as to obtain ALP labeled anti-PCB#126 antibody.

[0059]

#### Reference example 9

##### Measurement of PCB#126 (3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl)

Measurement of PCB#126 was performed with one step competitive assay using full automatic chemical luminescence immunoassay system (Lumipulse f: Fujirebio Inc.). To 150  $\mu$ l solution of TCP-BSA sensitizing particles and PCB#126-BSA sensitizing

particles prepared in Reference example 7, 90  $\mu$ l of standard antigen solution of PCB#126 and 50  $\mu$ l of enzyme labeled antibody solution was added. The immune reaction was performed at 37°C, for 20 minutes. After washing the particles, 200  $\mu$ l of a substrate solution was added, enzyme reaction was performed at 37°C, for 20 minutes, and luminescence was assayed.

[0060]

The standard antigen solution was prepared by dissolving PCB#77 (GL Sciences Inc.) in 10% dimethylsulfoxide solution. PCB#126 concentration was adjusted to 0 to 10ng/ml. Standard curve was prepared by plotting a response obtained from each concentration of standard antigen solutions ( $B/B_0$ ) when response of a count of 0% of standard antigen solution was set to 100%. Results are shown in Figure 2. Comparing TCP-BSA sensitizing particles with PCB#126-BSA sensitizing particles, TCP-BSA sensitizing particles had higher sensitivity. Results are shown in Table 1.

[0061]

In PCB#126 measuring system, using TCP-BSA sensitizing particles, cross reactivity with PCB#77 and PCB#169 were performed. The cross reactivity was 7.1% with PCB#77, whereas no cross reactivity with PCB#169 was found.

[0062]

Reference example 10

Preparation of sensitizing particles of hapten-BSA

PCB#169-BSA sensitizing particles were prepared in the same manner in which PCB#169 (3, 3', 4, 4', 5, 5' -hexachlorobiphenyl)-BSA (KRI) was used instead of TCP-BSA in Reference example 2.

[0063]

Reference example 11

Preparation of anti-PCB#169 antibody labeled with alkaliphosphatase

Alkaliphosphatase (ALP; Oriental Co., Ltd.) was bond to PCB#169 monoclonal antibody (PCB169E antibody; KRI), using maleimide, so as to obtain ALP labeled anti-PCB#169 antibody.

[0063]

## Reference example 12

### Measurement of PCB#169 (3, 3', 4, 4', 5, 5' -hexachlorobiphenyl)

Measurement of PCB#169 was performed with one step competitive assay using full automatic chemical luminescence immunoassay system (Lumipulse f: Fujirebio Inc.). To each 150  $\mu$ l solution of TCP-BSA sensitizing particles prepared in Reference example 7 or PCB#169-BSA sensitizing particles prepared in Reference example 10, 90  $\mu$ l of standard antigen solution and 50  $\mu$ l of enzyme labeled antibody solution was added. The immune reaction was performed at 37°C, for 20 minutes. After washing the particles, 200  $\mu$ l of a substrate solution was added, enzyme reaction was performed at 37°C, for 20 minutes, and luminescence was assayed.

[0064]

The standard antigen solution was prepared by dissolving PCB#169 (GL Sciences Inc.) in 10% dimethylsulfoxide solution. PCB#169 concentration was adjusted to 0 to 10ng/ml. Standard curve was prepared by plotting a response obtained from each concentration of standard antigen solutions ( $B/B_0$ ) when response of a count of 0% of standard antigen solution was set to 100%. Results are shown in Figure 1. Compared with TCP-BSA sensitizing particles and PCB#169-BSA sensitizing particles, TCP-BSA sensitizing particles had higher sensitivity. Results are shown in Table 1.

[0065]

In the PCB#169 measuring system, using TCP-BSA sensitizing particles, cross reactivity with PCB#77 and PCB#126 were performed. The cross reactivity was 6.3% with PCB#77, whereas 100% cross reactivity with PCB#126 was found.

[0066]

[Effect of the invention]

The phenoxy compound represented by the general formula (I) is a useful reagent for measuring PCB. The phenoxy compound represented by the general formula (I) is combined with, e.g., BSA and can be used for enzyme immunoassay.

## G. Translation of brief explanation of Figures

[Brief Explanation of Figures]

[Figure 1] Standard curve for measuring PCB#77

[Figure 2] Standard curve for measuring PCB#126

[Figure 3] Standard curve for measuring PCB#169

Figure 1

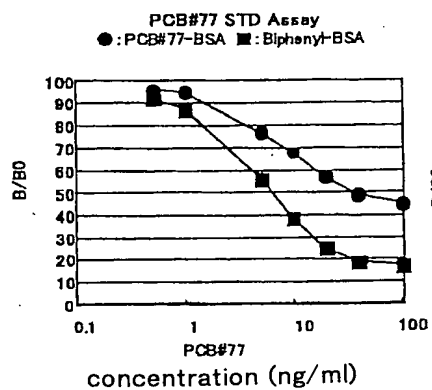


Figure 2

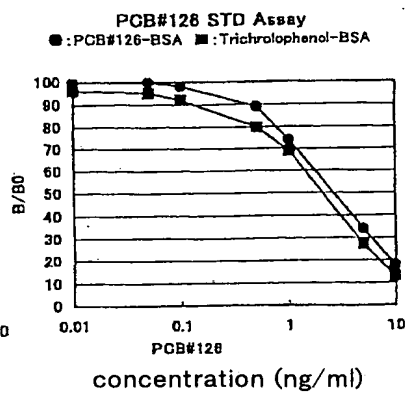


Figure 3

